



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 353 093**

② Número de solicitud: 200930189

⑤ Int. Cl.:
A61K 31/517 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **20.05.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.02.2011

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Martínez Gil, Ana;**
Redondo Sancho, Miriam;
Sanz San Cristóbal, Marina;
Gil Ayuso-Gontán, Carmen;
Morales García, José;
Pérez Castillo, Ana y
Pérez Martín, Concepción

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Uso de derivados de quinazolininas y sus composiciones farmacéuticas en enfermedades neurodegenerativas.**

㉑ Resumen:

Uso de derivados de quinazolininas y sus composiciones farmacéuticas en enfermedades neurodegenerativas. La invención se refiere a derivados heterocíclicos de quinazolininas y a su potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, entre otras la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o esclerosis. Además, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos derivados de quinazolininas.

ES 2 353 093 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de derivados de quinazolinas y sus composiciones farmacéuticas en enfermedades neurodegenerativas.

5 **Sector de la técnica**

La invención se dirige al campo de la química médica y más concretamente a derivados heterocíclicos de quinazolinas y a su potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, entre otras la enfermedad de Parkinson, y se enmarca por tanto en el sector farmacéutico.

10

Estado de la técnica

Las enfermedades neurodegenerativas son una de las principales causas de mortalidad en la población occidental. La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer (Dauer, W.; Przedborski, S., Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003, 39,889-909), afectando aproximadamente al 15% de las personas mayores de 65 años. Actualmente se dispone únicamente de terapias sintomáticas que, aunque son eficaces en las primeras etapas de la enfermedad poseen a largo plazo considerables efectos secundarios. Por tanto resulta necesario buscar nuevas terapias eficaces y seguras que consigan tratar dicha patología.

20

La EP se caracteriza por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Lang, AE.; Lozano, AM., Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine* 1998, 339,1044-1053 and Lang, AE.; Lozano, AM., Parkinson's disease. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 1998, 339,1130-1143) y por cuerpos de inclusión (cuerpos de Lewy) conteniendo α -sinucleína. La principal consecuencia de esta pérdida neuronal es una marcada disminución en la disponibilidad cerebral de dopamina en el núcleo caudado y en el putamen, áreas donde se proyectan las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Esto provoca una disfunción importante en la regulación de las principales estructuras cerebrales implicadas en el control del movimiento, los ganglios basales. Los síntomas clásicos parkinsonianos comprenden diskinesias (temblor en manos, brazos, piernas y cara), rigidez de las extremidades y el tronco, bradiquinesia (lentitud en los movimientos) e inestabilidad postural con problemas de equilibrio.

30

El descubrimiento de que la EP se caracterizaba por una pérdida de dopamina condujo al descubrimiento de terapias encauzadas a corregir esta deficiencia. Son terapias paliativas, dirigidas a tratar los síntomas de la enfermedad pero ninguna consigue detener su progresión (Savitt, JM.; Dawson, VL.; Dawson, TM., Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. *J Clin Invest* 2006, 116,1744-1754). Actualmente el precursor de la dopamina, la levodopa, es el tratamiento más efectivo en la EP (LeWitt, P.A., Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009, Suppl 1,S31-4). Este tratamiento a veces se combina con otros fármacos como inhibidores de descarboxilasa periférica (carbidopa) (Abdel-Salam, O.M., Drugs used to treat Parkinson's disease, present status and future directions. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2008, 7, 321-442), inhibidores de catecol-O-metil-transferasa (COMT) que prolongan la vida media de la levodopa (Gallagher, D. A.; Schrag, A., Impact of newer pharmacological treatments on quality of life in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2008, 22, 563-586) y agonistas de la dopamina que estimulan directamente los receptores de dopamina post-sinápticos (Kieburtz, K., Therapeutic strategies to prevent motor complications in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2008, 255, Suppl 4, 42-45). A pesar de todos estos avances en el tratamiento de los síntomas de la EP su eficacia disminuye con el tiempo fundamentalmente debido al desarrollo de complicaciones motoras como diskinesias y distonias.

45

Ante las grandes limitaciones que ofrecen las terapias actuales, tanto farmacológicas como quirúrgicas, existe la necesidad de desarrollar otras alternativas que permitan frenar o detener el desarrollo de la enfermedad (Poewe, W., Treatments for Parkinson disease-past achievements and current clinical needs. *Neurology* 2009, 72, 7 Suppl, S65-73). Las investigaciones actuales se centran en la prevención de la degeneración neuronal dopaminérgica y en el descubrimiento de nuevos fármacos, alternativos a la levodopa, que consigan frenar la progresión de la enfermedad e incluso generar nuevas neuronas de tipo dopaminérgico. Recientemente han surgido diferentes clases de familias químicas con potencial en esta patología, siendo los inhibidores de fosfodiesterasa uno de ellos (Use of pde7 inhibitors for the treatment of movement disorders, USPTO Application: 20080260643, WO2008/113881). Dada nuestra experiencia previa en este área (Castaño, T.; Wang, H.; Campillo, N.E.; Ballester, S.; González-García, C.; Hernández, J.; Pérez, C.; Cuenca, J.; Pérez-Castillo, A.; Martínez, A.; Huertas, O.; Gelpí, J.L.; Luque, F.J.; Ke, H.; Gil, C., Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors. *Chem-MedChem.* 2009, 4, 866-876), demostramos la utilización de derivados heterocíclicos de quinazolina como agentes efectivos en modelos de Parkinson *in vivo* y proponemos su utilización no solo en esta patología neurodegenerativa sino también en otras enfermedades neurológicas debido a su efecto neuroprotector en todas las patologías del sistema nervioso donde se produzca la muerte neuronal.

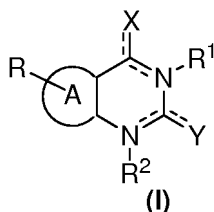
60

65

Descripción de la invención**Descripción breve**

5 Un objeto de la presente invención es el uso de un compuesto de fórmula (I):

10



15

donde:

20

A, es un carbociclo o heterociclo fusionado opcionalmente sustituido de 5, 6 ó 7 miembros saturado o insaturado, --- puede ser un doble enlace;

25

X e Y, son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, alquil, =O, =S, aril, O-alquil, O-aril, S-alquil o -S-aril; y

30

R, R¹, y R² son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril, heteroaril, -OR³; -C(O)OR³, (CH₂)_n-C(O)OR³ o -S(O)_t-, donde n es mayor o igual a 0, donde t es 1 o 2, y donde R³ es elegido de entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril o heteroaril,

35

o bien una sal, derivado, profármacos, solvato o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas incluyendo, pero no limitadas a, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia cerebral, y/o de patologías o enfermedades neurológicas en las que el sistema dopaminérgico esté involucrado, incluyendo, pero no limitadas a, parkinsonismos post-encefalítico, distonías, síndrome de Tourette's, patologías de movimientos límbicos periódicos, síndrome de piernas inquietas, trastornos de déficit de atención con hiperactividad.

40

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), o mezclas de los mismos, una sal, derivado, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

45

Descripción detallada

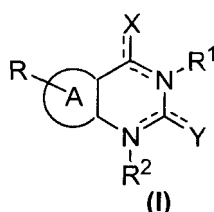
50

La presente invención se basa en que los inventores han demostrado que los compuestos de fórmula (I) son neuroprotectores en cultivos primarios de astrocitos y glia y/o líneas celulares dopaminérgicas (Ejemplos 1-2), así como en un modelo *in vivo* de neurotoxicidad inducida por lipopolisacáridos (LPS) (Ejemplo 3), por lo que pueden ser usados en la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o enfermedades neurológicas.

55

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es el uso de un compuesto enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas y que presenta la fórmula (I):

60



65

ES 2 353 093 A1

donde:

A, es un carbociclo o heterociclo fusionado opcionalmente sustituido de 5, 6 ó 7 miembros saturado o insaturado,

5 --- puede ser un doble enlace;

X e Y, son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, alquil, =O, =S, aril, O-alquil, O-aril, S-alquil o -S-aril; y

10 R, R¹ y R² son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril, heteroaril, -OR³; -C(O)OR³, (CH₂)_n-C(O)OR³ o -S(O)_t, donde n es mayor o igual a 0, donde t es 1 o 2 y donde R³ es elegido de entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril o heteroaril,

15 o bien una sal, derivado, profármaco, solvato o estereoisómeros farmacéuticamente aceptables del mismo.

Un objeto particular de la invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención de fórmula (I) para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, y más preferentemente, perteneciente, a título
20 ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (S14),

25 - 3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (TC.2.43),

- 3-(2-Bromofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (TC.3.14),

- 3-(2,6-Difluorofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (TC.3.23),

30 - 3-(2-Bromofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (TC.3.22),

- 3-Fenil-2,4-ditioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (TC.3.6),y

- 3-Fenil-2-metiltio-4-tioxo-3,4-dihidroquinazolina (TC.3.9).

35

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula (I), y más concretamente, los compuestos específicos pertenecientes a esta fórmula general anteriormente descrita pueden incluir isómeros, dependiendo de la presencia de enlaces múltiples (por ejemplo, Z, E), incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros individuales y las mezclas de los mismos caen dentro del alcance de la presente invención. Los enantiómeros o diastereoisómeros individuales, así como sus mezclas, pueden separarse mediante técnicas convencionales.

45 Tal como aquí se utiliza, el término “derivado” incluye tanto a compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir, derivados del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como derivados farmacéuticamente no aceptables ya que éstos pueden ser útiles en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del derivado farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable.

50 Asimismo, dentro del alcance de esta invención se encuentran los profármacos de los compuestos de fórmula (I). El término “profármaco” tal como aquí se utiliza incluye a cualquier compuesto derivado de un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, ésteres, incluyendo ésteres de ácidos carboxílicos, ásteres de aminoácidos, ásteres de fosfato, ásteres de sulfonato de sales metálicas, etc., carbamatos, amidas, etc., que, cuando se administra a un individuo es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, dicho compuesto de fórmula (I) en dicho individuo. Ventajosamente, dicho
55 derivado es un compuesto que aumenta la biodisponibilidad del compuesto de fórmula (I) cuando se administra a un individuo o que potencia la liberación del compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico. La naturaleza de dicho derivado no es crítica siempre y cuando pueda ser administrado a un individuo y proporcione el compuesto de fórmula (I) en un compartimento biológico de un individuo. La preparación de dicho profármaco puede llevarse a cabo mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

60

Los compuestos de la invención pueden estar en forma cristalina como compuestos libres o como solvatos y se pretende que ambas formas estén, dentro del alcance de la presente invención. En este sentido, el término “solvato”, tal como aquí se utiliza, incluye tanto solvatos farmacéuticamente aceptables, es decir, solvatos del compuesto de fórmula (I) que pueden ser utilizados en la elaboración de un medicamento, como solvatos farmacéuticamente no aceptables, los cuales pueden ser útiles en la preparación de solvatos o sales farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del solvato farmacéuticamente aceptable no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el solvato es un hidrato. Los solvatos pueden obtenerse por métodos convencionales de solvatación bien conocidos por los técnicos en la materia.

65

Para su aplicación en terapia, los compuestos de fórmula (I), sus isómeros, sales, profármacos o solvatos, se encontrarán, preferentemente, en una forma farmacéuticamente aceptable o sustancialmente pura, es decir, que tiene un nivel de pureza farmacéuticamente aceptable excluyendo los aditivos farmacéuticos normales tales como diluyentes y portadores, y no incluyendo material considerado tóxico a niveles de dosificación normales. Los niveles de pureza para el principio activo son preferiblemente superiores al 50%, más preferiblemente superiores al 70%, más preferiblemente superior al 90%. En una realización preferida, son superiores al 95% del compuesto de fórmula (I), o de sus sales, solvatos o profármacos.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos de la invención también incluyen compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen dicha estructura, a excepción de la sustitución de un hidrógeno por un deuterio o por tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C o un nitrógeno enriquecido en ^{15}N , están dentro del alcance de esta invención.

Los compuestos descritos en la presente invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, profármacos y/o solvatos así como las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden ser utilizados junto con otros fármacos adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I), o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el uso de los compuestos de fórmula general (I) útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, en cantidad terapéuticamente efectiva, o mezclas de los mismos, una sal, derivado, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención, que comprende un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de tener un efecto neuroprotector en cultivos primarios de astrocitos y glia y/o líneas celulares dopaminérgicas, calculada para producir el efecto deseado *in vivo* y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En otra realización particular, dicha composición terapéutica se prepara i en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, u en otros habituales o similares de la Farmacopeas Española y en Estados Unidos.

Otro objeto adicional de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto de la invención de fórmula (I), o sus mezclas para la elaboración de un medicamento, en adelante uso de un compuesto de la invención, dirigido al tratamiento de patologías o enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas, incluyendo, pero no limitadas a, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia cerebral, parkinsonismos post-encefálico, distonías, síndrome de Tourette's, patologías de movimientos límbicos periódicos, síndrome de piernas inquietas, trastornos de déficit de atención con hiperactividad.

El uso de los compuestos de la invención es compatible con su uso en protocolos en que los compuestos de la fórmula (I), o sus mezclas se usan por sí mismos o en combinaciones con otros tratamientos o cualquier procedimiento médico.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Efecto neuroprotector de los compuestos en cultivos primarios de astrocitos estimulados por lipopolisacárido (LPS).

Figura 2.- Efecto neuroprotector de los compuestos en cultivos primarios de microglia estimulados por LPS.

Figura 3.- Neuroprotección en la línea celular dopaminérgica SH-SY5Y.

Figura 4.- (A) Viabilidad de las células dopaminérgicas de las neuronas de “*substantia nigra*” después de un daño inducido por LPS. (B) Activación microglial en respuesta a LPS.

5

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

10

Medida del efecto neuroprotector de los compuestos de fórmula (I) por producción de nitritos en diferentes líneas celulares

Se utilizan fundamentalmente cultivos primarios de microglia y astrocitos (Luna-Medina, R.; Cortes-Canteli, M.; Alonso, M.; Santos, A.; Martínez, A.; Pérez-Castillo, A., Regulation of inflammatory response in neural cells *in vitro* by thiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. J. Biol. Chem. 2005, 280, 21453-21462). Los cultivos primarios de astrocitos y microglia se obtienen a partir de corteza e hipocampo de ratas de 2 días de edad post-natal. Tras diseccionar la corteza e hipocampo y limpiarlos de meninges se disgregan las células por trituración mecánica e incubación con 0.25% de tripsina/EDTA a 37°C durante 45 minutos. Se añade DMEM con 10% suero fetal para parar la digestión con tripsina y se termina de triturar el tejido mecánicamente. Se centrifuga a 800 xg/5 min. y el precipitado se lava 3 veces en EBSS; finalmente se resuspenden las células en DMEM más 10% suero fetal y se siembran a una densidad de 0.5×10^5 células/cm². Se incuban durante 10-12 días al cabo de los cuales se observa una monocapa de astrocitos sobre la que se adhieren ligeramente las células de microglia. Para aislar las células de microglia los frascos de cultivo se incuban en un agitador rotatorio a 37°C durante 4 horas a 250 rpm y el medio conteniendo la microglia se centrifuga a 1500 xg/5 min. Las células de microglia se resuspenden en DMEM/10% FBS y se siembran a una densidad de $2-4 \times 10^5$ células/cm². Después de 1 hora de incubación, para permitir que se adhieran a la placa, se lavan con TD y se incuban en DMEM/10% FBS durante 24 horas a partir de las cuales se utilizan para los diversos experimentos. El grado de pureza de estos cultivos se determina por estudios de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos para neuronas (β -tubulina y MAP2), astrocitos (GFAP), oligodendrocitos (CNPasa) y microglia (OX42).

Cultivos celulares de astrocitos y microglia se tratan con LPS (10 μ g/ml) en ausencia y presencia de los diferentes compuestos. Los compuestos se añaden 1 h antes que el estímulo inflamatorio. A diferentes tiempos después de la incubación, las células se lavan y se recogen para realizar las correspondientes medidas del efecto de los compuestos en la producción de NO (óxido nítrico) por la iNOS (sintasa del óxido nítrico inducible) como indicador de un daño neural debido a procesos inflamatorios (Kroncke K. D.; Fehsel K.; Kolb-Bachofen V., Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when, and where? Nitric Oxide 1997, 1, 107-120). Para ello, después de 24 h de incubación se determina la cantidad de nitritos, uno de los productos de oxidación del NO. Para ello, se utiliza el método basado en la reacción de Griess (Griess, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt Ueber einige azoverbindungen. Chem. Ber. 1879, 12, 426-428): 100 μ l de sobrenadante de los cultivos se mezclan con 100 μ l de reactivo de Griess en una placa de 96 pocillos incubándose durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se mide la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. La cantidad de nitritos producido se determina utilizando una curva patrón de nitrito sódico.

45 Compuestos de referencia en el ensayo: rolipram y BRL50481.

Ver Figuras 1 y 2.

Ejemplo 2

Ensayo de neuroprotección en células de neuroblastoma SH-SY5Y

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y se expuso a una concentración 50 μ M de la neurotoxina 6-hidroxydopamina (6-OHDA) en presencia o ausencia de S14 o TC3.6. 6-OHDA es una sustancia muy tóxica para estas células y la incubación con ella provoca una muerte celular significativa, siendo un modelo celular de parkinsonismo *in vitro* muy utilizado (Mendez, J.S.; Finn, B.W., Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. J Neurosurg. 1975, 42, 166-173.). La viabilidad celular se determina utilizando el compuesto bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) que mide la integridad de la función mitocondrial. Cada dato representa la media \pm SD de cinco replicados en tres experimentos diferentes. **P* < 0.05 y ***P* < 0.01, diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes experimentos.

Ver figura 3.

65

Ejemplo 3

Supervivencia neuronal in vivo

5 En la *substantia nigra* (SN) de ratas adultas se inyecta unilateralmente lipopolisacárido (LPS, 5 μ g) o vehículo. Uno de los grupos de animales además recibió 5 nmol de S14 en la inyección. Después de tres días de la operación, los animales se perfunden intracardíacamente con 4% de paraformaldehído en PBS, durante aproximadamente 45-60 minutos. Terminada la perfusión se extrae el cerebro y se deja en la solución de paraformaldehído durante 24 horas después de las cuales se cambia a una solución de 4% paraformaldehído/30% sacarosa durante aproximadamente 48
10 horas. Los cerebros fijados de esta manera se congelan en nieve carbónica y se hacen cortes de 25 μ m en un criostato. Para tinciones con un solo anticuerpo, éstas se llevarán a cabo con el sistema ABC (ABC Elite kit, Vector). Los cortes seleccionados se lavan con PBS y se tratan con una solución de metanol/PBS/H₂O/H₂O₂ para bloquear peroxidasas endógenas. Después de lavar con PBS los cortes se bloquean con 0.1 M lisina/5% suero/0.1% tritón X-100/4% BSA en PBS. La incubación con el correspondiente anticuerpo primario se realiza a 4°C durante 18 horas en PBS con 4%
15 BSA, 1% suero y 0.1% tritón X-100. Después de lavar con PBS, los cortes se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente en PBS conteniendo 4% BSA, 1% suero y 0.1% tritón X-100, a una dilución 1:200. Una vez terminada la incubación se añade el kit de ABC y se incuban los cortes durante 1 hora. Después de lavar con PBS se revelan con DAB y, se montan en portas gelatinizados y se deshidratan para su posterior observación por microscopía. La integridad neuronal se mide mediante tinción convencional de Nissl
20 y la supervivencia de células dopaminérgicas tiñendo los cortes con un anticuerpo específico anti-tirosina hidroxilasa (TH). La activación glial se determina utilizando anticuerpos anti-GFAP (tiñe astrocitos reactivos) y anti-CD11 b (OX-42, tiñe microglia activada).

Ver figura 4.

25

30

35

40

45

50

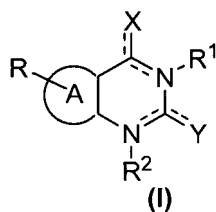
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):



donde:

A, es un carbociclo o heterociclo fusionado opcionalmente sustituido de 5, 6 ó 7 miembros saturado o insaturado,

--- puede ser un doble enlace;

X e Y, son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, alquil, =O, =S, aril, O-alquil, O-aril, S-alquil o -S-aril; y

R, R¹ y R² son elegidos independientemente entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril, heteroaril, -OR³; -C(O)OR³, (CH₂)_n-C(O)OR³ o -S(O)_t, donde n es mayor o igual a 0, donde t es 1 o 2 y donde R³ es elegido de entre el grupo consistente en hidrógeno, halógeno, alquil, haloalquil, aril, cicloalquil, (CH₂)_n-aril o heteroaril.

o bien una sal, derivado, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptables del mismo,

para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas.

2. Uso según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el compuesto de fórmula (I) pertenece a una, o a varias, de las siguientes familias de compuestos:

- 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

- 3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

- 3-(2-Bromofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

- 3-(2,6-Difluorofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina,

- 3-(2-Bromofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina,

- 3-Fenil-2,4-ditioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina, y

- 3-Fenil-2-metiltio-4-tioxo-3,4-dihidroquinazolina

o a cualquiera de sus formas enantioméricas R, S y/o mezclas racémicas.

3. Composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende por lo menos un compuesto, en cantidad terapéuticamente efectiva, de fórmula (I), o mezclas de los mismos, una sal, derivado, profármaco, solvato o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo junto con un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración a un paciente.

4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el compuesto de fórmula (I) pertenece a una, o a varias, de las siguientes familias de compuestos:

- 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

- 3-(2,6-difluorofenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

- 3-(2-Bromofenil)-8-metil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina,

ES 2 353 093 A1

- 3-(2,6-Difluorofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina,

- 3-(2-Bromofenil)-8-metil-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina,

5 - 3-Fenil-2,4-ditioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina, y

- 3-Fenil-2-metiltio-4-tioxo-3,4-dihidroquinazolina

o a cualquiera de sus formas enantioméricas R, S y/o mezclas racémicas.

10

5. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas.

15

6. Uso de un compuesto según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la enfermedad neurodegenerativa y/o neurológica pertenece al siguiente grupo: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, isquemia cerebral, parkinsonismos post-encefálico, distonias, síndrome de Tourette's, patologías de movimientos límbicos periódicos, síndrome de piernas inquietas, trastornos de déficit de atención con hiperactividad.

20

25

30

35

40

45

50

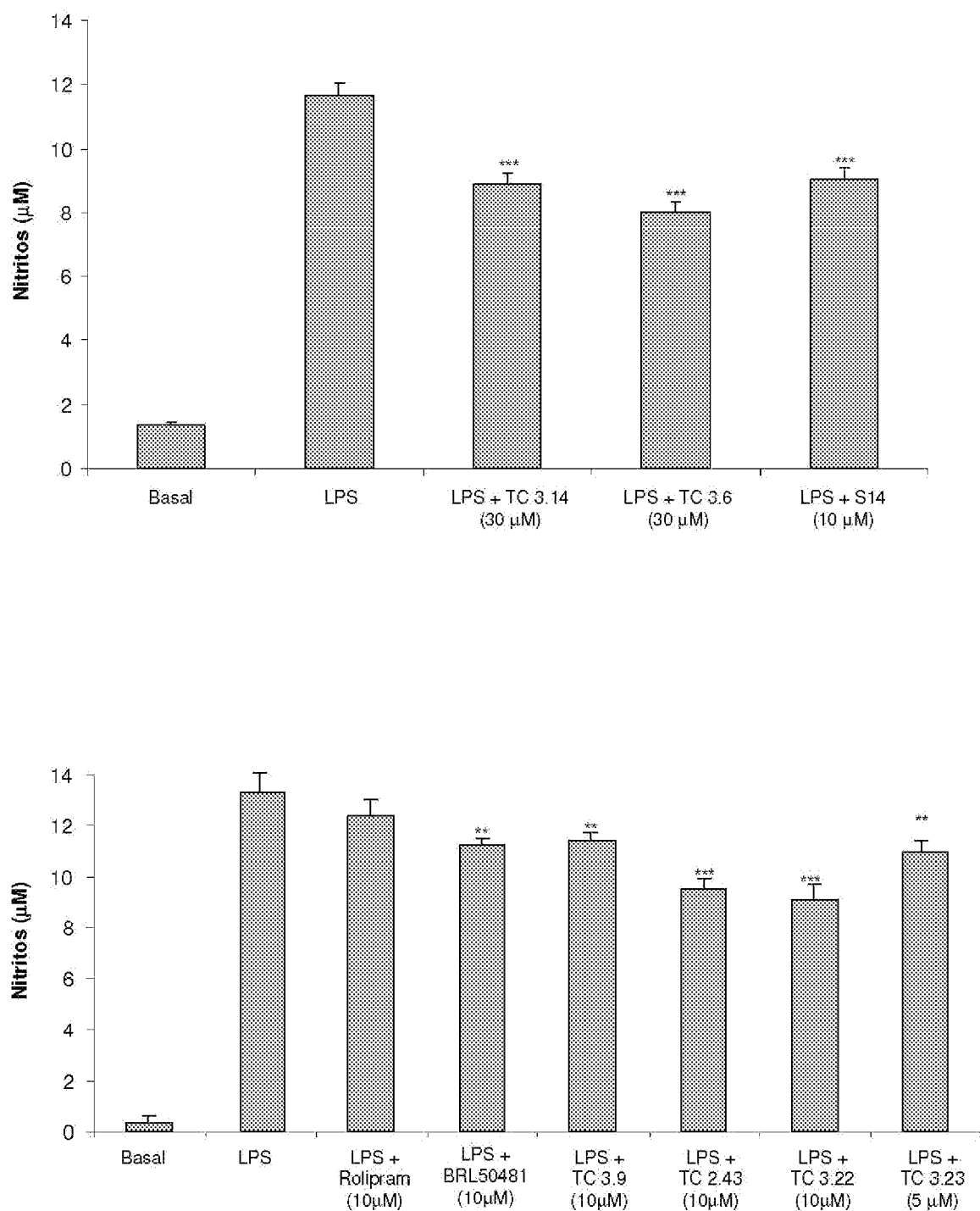
55

60

65

FIG. 1

Producción de nitritos en astrocitos estimulados con LPS



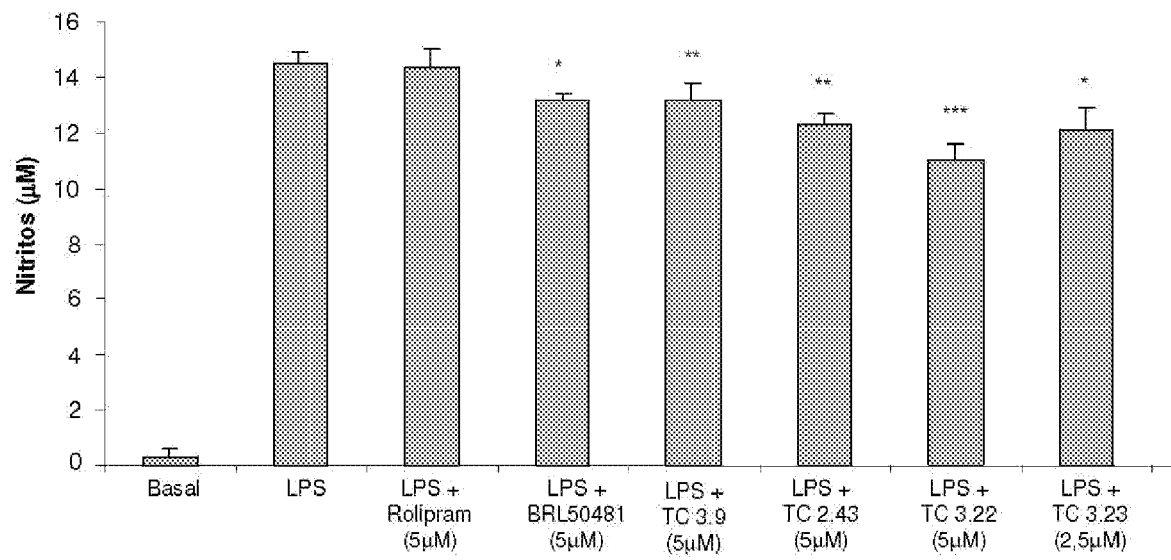
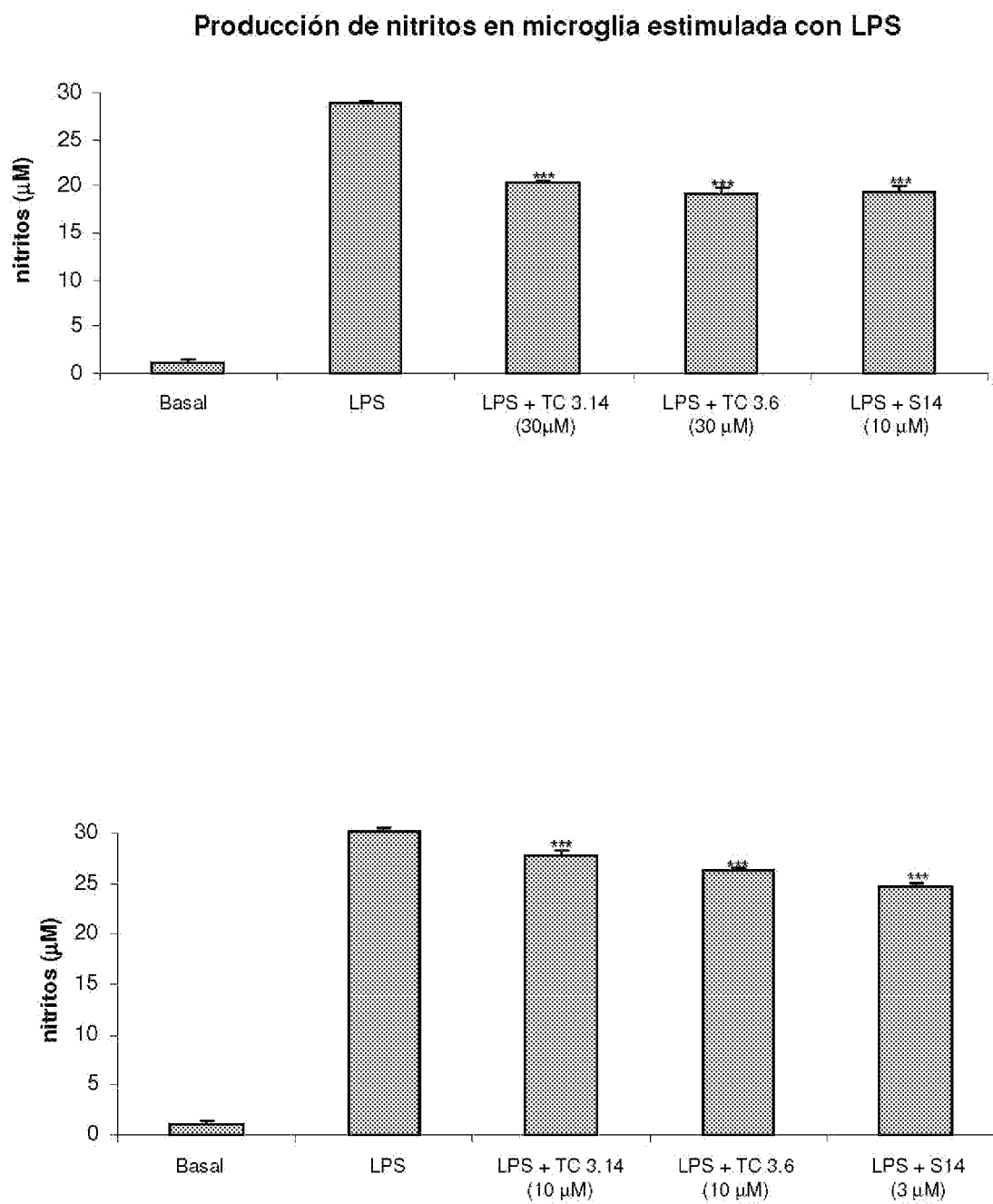


FIG. 2



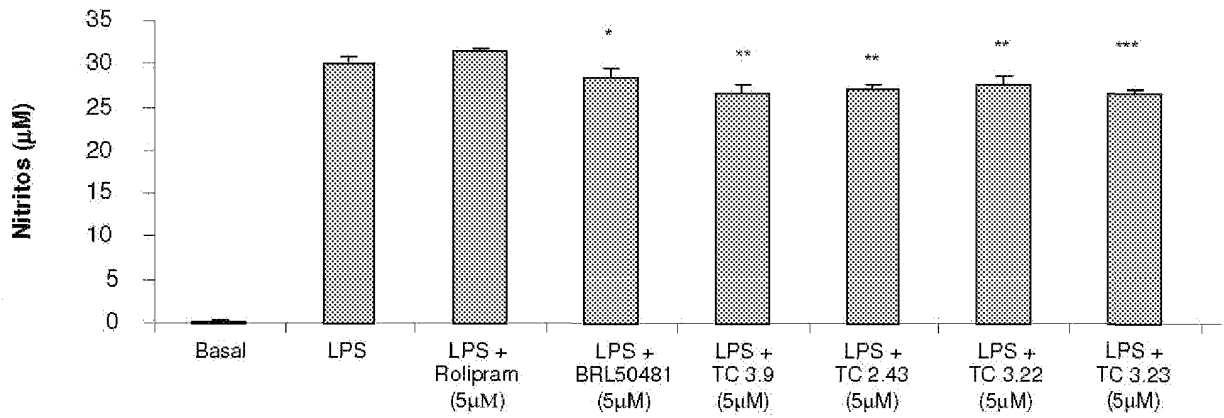
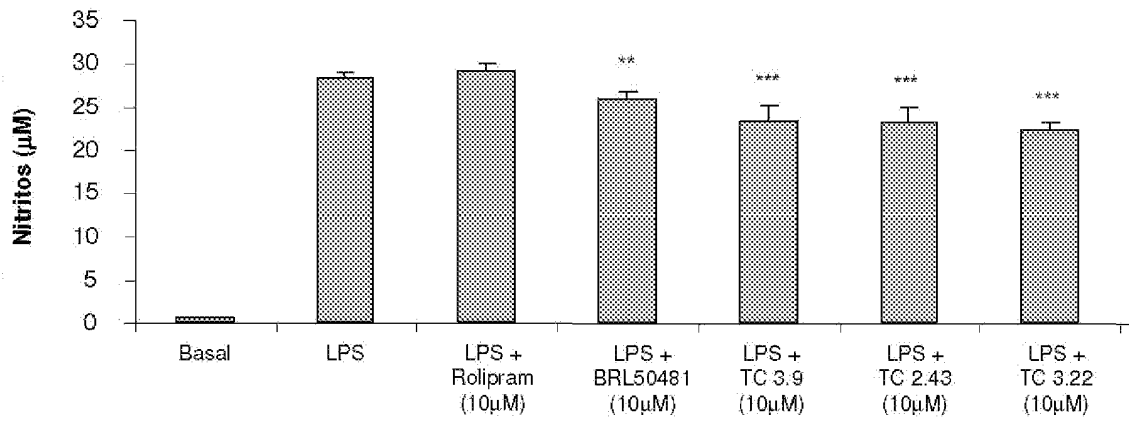


FIG. 3

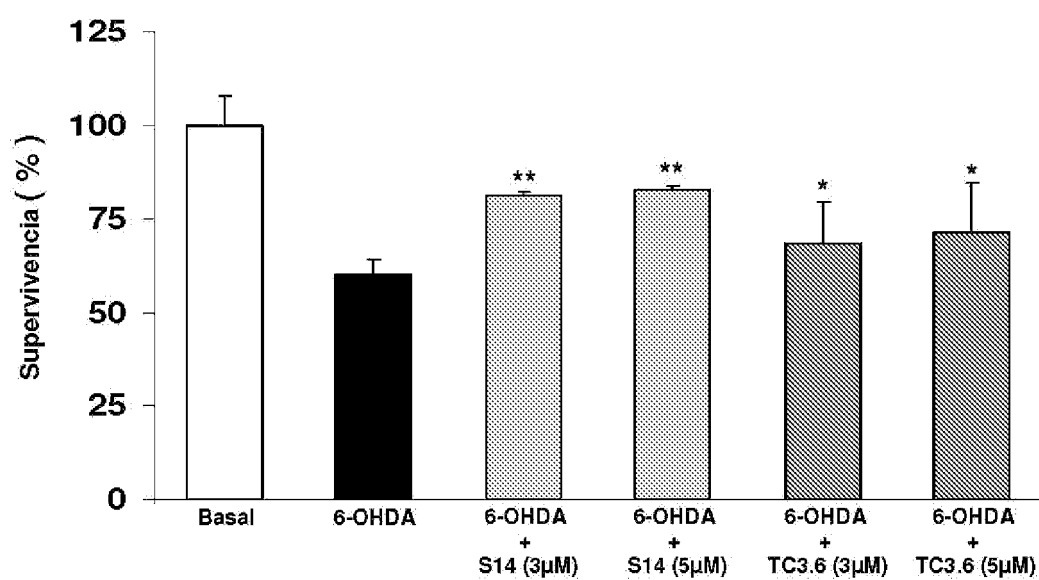
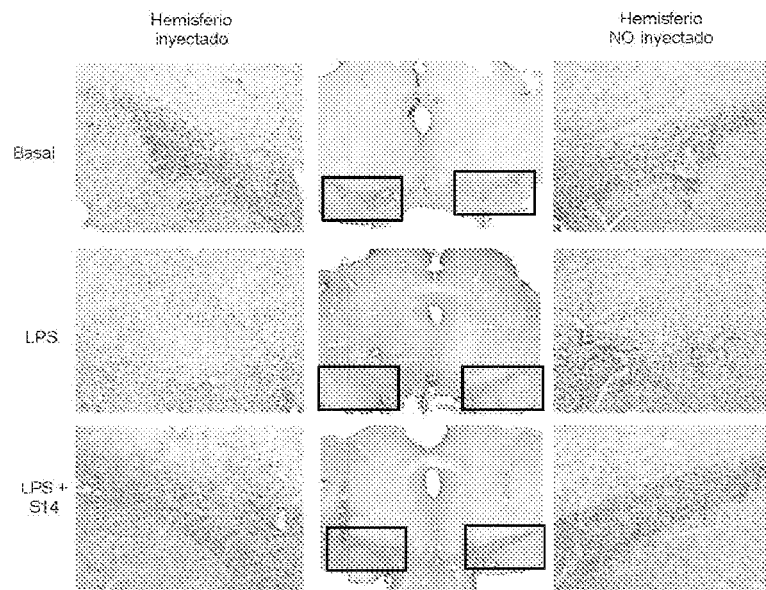
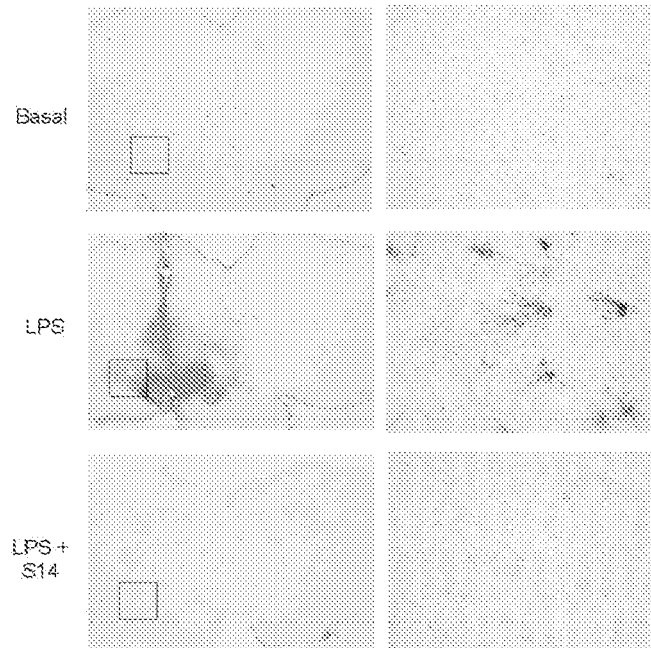


FIG. 4

A)



B)





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200930189

②² Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K31/517** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2008113881 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 25.09.2008, figuras, reivindicaciones	3,4
X	EP 276825 A1 (NISSHIN FLOUR MILLING CO, LTD) 03.08.88, reivindicaciones	3
A	MENNITI, F.S. ET AL.: "Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development". Nature reviews drug discovery, 2006, vol. 5, n.8, páginas 660-670.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.02.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS,

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1, 2, 5, 6	SI
	Reivindicaciones 3, 4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1, 2, 5, 6	SI
	Reivindicaciones 3, 4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2008113881 A1	25.09.2008
D02	EP 276825 A1	03.08.1988

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen compuestos de fórmula I (derivados de quinazolina) y a su uso en la elaboración de medicamentos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y/o neurológicas tales como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, etc.

Los documentos D1 y D2 se refieren a composiciones farmacéuticas que contienen derivados de quinazolinona y su uso en el tratamiento de procesos inflamatorios y autoinmunes (documento D1) o como agentes antiulcerosos.

Por lo tanto, las reivindicaciones 3 y 4 carecen de novedad según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.

En ninguno de los documentos citados se cita la utilización de estos compuesto en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por lo que las reivindicaciones 1, 2, 5 y 6 presentan novedad y actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P.